

526,035

10/526035

(12) NACH DEM VERTRETERN ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENFASSUNG AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
25. März 2004 (25.03.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 2004/024907 A1**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C12N 9/16, 9/20

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2003/009625

(22) Internationales Anmeldedatum:  
29. August 2003 (29.08.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
102 40 154.3 30. August 2002 (30.08.2002) DE

(71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): DEGUSSA AG [DE/DE]; Dr.-Albert-Frank-Str. 32, 83308 Trostberg (DE). DEGUSSA FOOD INGREDIENTS GMBH [DE/DE]; Dr.-Albert-Frank-Str.32, 83308 Trostberg (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): ULRICH-HOFMANN, Renate [DE/DE]; Amselweg 50d, 06110 Halle (DE). BEZAKOVA, Lydia [SK/SK]; Studenohorska 85, 85103 Bratislava (SK). OBLOZINSKY, Marek [SK/SK]; Viglasska 6, 85197 Bratislava (SK).

(74) Anwalt: WEICKMANN & WEICKMANN; Postfach 860 820, 81635 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Veröffentlicht:**

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

Zur Erklärung der Zwei-Buchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: VEGETABLE PROTEIN FRACTION WITH PHOSPHOLIPASE D ACTIVITY

A1

(54) Bezeichnung: PFLANZLICHE PROTEINFRAKTION MIT PHOSPHOLIPASE D-AKTIVITÄT

(57) **Abstract:** The invention relates to a novel protein fraction with phospholipase D activity. Said fraction originates from members of the Papaveraceae family, in particular Papaver somniferum and is composed of two protein sub-fractions A and B, whose molecular mass lies in particular around 116.4 kDa or 114.1 kDa and which have an isoelectric point pl of 8.7 or 6.7 and an optimum hydrolytic activity at pH 8.0 or 5.5. The two sub-fractions are primarily activated by Zn<sup>2+</sup> ions and constitute two isoenzymes. Said protein fractions are primarily used for the hydrolysis and/or transphosphatidylation of phospholipids and their lysoforms.

(57) **Zusammenfassung:** Es wird eine neue pflanzliche Proteinfraktion mit Phospholipase D-Aktivität beansprucht, die aus Vertretern der Familie Papaveraceae und insbesondere Papaver somniferum stammt und die sich aus zwei Proteinunterfraktionen A und B zusammensetzt, deren Molekulargröße insbesondere bei 116,4 kDa bzw. 114,1 kDa liegt, die einen isoelektrischen Punkt pl von 8,7 bzw. 6,7 besitzen und die ein hydrolytisches Aktivitätsoptimum bei pH 8,0 bzw. 5,5 aufweisen. Die beiden Unterfraktionen werden vor allem durch Zn<sup>2+</sup>-Ionen aktiviert und stellen zwei Isoenzyme dar. Eingesetzt wird diese Proteinfraktion vor allem zur Hydrolyse und/oder Transphosphatidylierung von Phospholipiden und deren Lyso-Formen.

WO 2004/024907 A1

## Pflanzliche Proteinfraktion mit Phospholipase D-Aktivität

### Beschreibung

5

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine pflanzliche Proteinfraktion mit Phospholipase D-Aktivität.

Phospholipase D (PLD), bei der es sich um eine Phosphatidylcholin-10 Cholinhydrolase (EC 3.1.4.4) handelt, ist ein wichtiges Enzym des Phospholipidmetabolismus und ist in der Natur weit verbreitet.

Phospholipase D wird einer Enzymklasse zugerechnet, deren Vertreter in heterogenen Systemen wasserunlösliche Substrate umsetzen können, da sie 15 an der Grenzfläche zwischen einem Lipid und Wasser Reaktionen katalysieren können. Dieses amphiphile Verhalten der Phospholipase D hat sie für die Wissenschaft besonders interessant erscheinen lassen, so dass in den vergangenen Jahrzehnten zahlreiche unterschiedliche Phospholipasen D (-Spezies) aus den unterschiedlichsten Quellen isoliert werden konnten.

20 Insbesondere wird PLD eine Beteiligung an zellregulatorischen Aktivitäten im Zusammenhang mit dem interzellulären Signalaustausch zugeschrieben. Über ihre Hydrolyse-Aktivität hinaus können PLD-Enzyme auch Phosphatidyl-Reste auf Alkohole übertragen. Allgemein werden PLD-25 Varianten deshalb für den biokatalytischen Austausch von Kopfgruppen der Phospholipide eingesetzt.

So sind z.B. Enzymfraktionen aus Plastiden von Zuckerrübe, Spinat oder Kohlblättern bekannt, sowie aus Chromoplasten von Karotten.

Entsprechende Fraktionen mit Phospholipase D-Aktivität wurden ebenfalls 30 aus Mitochondrien und Mikrosomen unreifer Erdnussssamen gewonnen, aber auch aus Ricinus-Samen, Arabidopsis-Spezies und Tomate.

- 2 -

Auch aus entfettetem Baumwollsamenmehl ist es gelungen, ein entsprechendes Enzym zu extrahieren.

Neben pflanzlichen Quellen dienen auch Mikroorganismen als Quelle, wobei

5 insbesondere Corynebakterien (*Corynebacterium ovis*), *Escherichia coli*, Bäckerhefezellen und Streptomyzeten (*Streptomyces hachijoensis*) zu nennen sind.

Phospholipase konnte aber auch aus Säugetierzellen isoliert werden, wie

10 z. B. aus menschlichen Eosinophilen und Rattenhirnmikrosomen.

Hinsichtlich des Molekulargewichts bietet sich bezüglich der bekannten Phospholipasen D ein heterogenes Bild:

15 So weist das aus Baumwollsamen isolierte lösliche Enzym ein Molekulargewicht von 71 000 – 3 000 Da auf; Phospholipase D aus Erdnusssamen besitzt ein Molekulargewicht von 200 000 – 10 000 Da und PLD aus menschlichen Eosinophilen ein Molekulargewicht von ca. 60 000 Da.

20

Entsprechende bakterielle Enzyme, wie sie bspw. aus *Corynebacterium ovis* isoliert werden können, besitzen ein Molekulargewicht von annähernd 90 000 Da.

25 Hinsichtlich des isoelektrischen Punktes sind für Phospholipase D aus Erdnusssamen pl-Werte von 4,65 bekannt, wo hingegen der pl eines Rohextraktes aus menschlichen Eosinophilen zwischen 4,8 und 5,0 liegt und durch zusätzliche Aufreinigung einen Wert zwischen 5,8 und 6,2 annehmen kann.

30

Die Aufreinigung von PLD aus Weißkohl in zwei Schritten beschreibt R. Lambrecht et al („A facile purification procedure of phospholipase D from

cabbage and its characterization"; (1992) Biol. Chem. Hoppe Seyler Vol 373 (2) 81-88). Diese Methode umfasst eine Ammoniumsulfat-Präzipitation und eine darauffolgende  $\text{Ca}^{2+}$ -vermittelte Affinitätschromatographie.

- 5 Der Veröffentlichung von I. Schäffner et al („Genomic structure, cloning and expression of two phospholipase D isoenzymes from white cabbage.“; Eur. J. Lipid Sci. Technol. 104, 79-87 (2002); entsprechend Dissertation (2001)) kann entnommen werden, wie rekombinante Phospholipase D-aktive Isoenzyme aus Weißkohl über Klonierungsverfahren erhalten werden können
- 10 und wie man diese Isoenzyme hinsichtlich ihrer spezifischen Hydrolyseaktivität in Abhängigkeit vom pH-Wert und von der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration sowie hinsichtlich ihrer Transposphatidylierungseigenschaften charakterisieren kann.
- 15 Einen allgemeinen Überblick zum Kenntnisstand bezüglich Phospholipase D gibt der Übersichts-Beitrag von Michael Heller in Advanced Lipid Research, 1978, Band 16, Seiten 267 bis 326.

A. Lerchner et al beschreiben in „Identification of two isoenzymes of

- 20 phospholipase D from opium poppy“ (Direct submission (2001) NCBI GenBank, accessions nos. AAL48261 – AAK48264 und Multipler Sequenzvergleich) zwei trunkierte Phospholipase D1 Polypeptide sowie zwei weitere trunkierte Phospholipase D2 Polypeptide aus Papaver somniferum. Wie aus dem multiplen Sequenzvergleich entnommen werden kann, haben
- 25 die Teilaminosäure-Sequenzen der Proteine D1 und D2 eine Sequenzidentität von 98% zueinander. Zudem besitzen die beschriebenen Teilsequenzen eine hohe Homologie (70-84%) zu den gut charakterisierten Phospholipase D-Varietäten des  $\alpha$ -Typs. Da die Sequenz-Ermittlung am 5'-Ende nicht vollständig ist, ist es allerdings nicht möglich, die
- 30 Phospholipase D1- und D2-Polypeptide einem definierten Enzym zuzuordnen.

- 4 -

Der Datenbankeintrag von A. Lerchner et al „Identification of two isoenzymes of phospholipase D from opium poppy“ (Direct submission (2001) NCBI GenBank, accession nos. AF451979 – AF451982) beschreibt Nukleinsäuresequenzen zu den eben bezeichneten beiden Polypeptiden

5 PLD1 und PLD2.

Von Mohn-Samen ist bekannt, dass sie in der Lage sind, in außergewöhnlich hohem Ausmaß sekundäre Metabolite zu bilden. So können bspw. schon nach wenigen Tagen des Anquellens Alkaloide wie Thebain im Mohn-Samen

10 nachgewiesen werden, was sie vor allem auch im Hinblick auf die Opium-Gewinnung interessant macht.

Da Phospholipase D (PLD) eine immer wichtigere Rolle bei der industriell genutzten katalytischen Hydrolyse von Glycerophospholipiden wie z.B.

15 Phosphatidylcholin (PC) zu Phosphatidsäure (PA) spielt, aber auch bei Transphosphatidylierungs-Vorgängen zum Kopfgruppenaustausch der Phospholipide, hat sich für die vorliegende Erfindung die Aufgabe gestellt, neue pflanzliche und aus Vertretern der Familie Papaveraceae stammende Proteinfraktionen mit Phospholipase D-Aktivität zu isolieren.

20

Gelöst wurde diese Aufgabe durch eine entsprechende Proteinfraktion, die dadurch gekennzeichnet ist, dass

a) sie aus zwei Protein-Unterfraktionen A und B besteht und

b) sie durch  $Zn^{2+}$ -Ionen aktivierbar ist sowie

25 c) die Unterfraktionen A und/oder B Kohlenhydratanteile aufweisen, und wobei die Protein-Unterfraktion A ausschließlich eine Hydrolyse-Aktivität besitzt.

Unter den nachfolgend verwendeten Begriff "Proteinfraktion" fallen

30 definitionsgemäß alle tatsächlichen Proteinfraktionen und Proteine sowie deren mögliche Varianten und auch sämtliche Enzyme und Enzym-Varianten, alle mit entsprechender PLD-Aktivität.

Überraschend konnte bei dieser pflanzlichen Proteinfaktion festgestellt werden, dass sie zwei Isoenzymeinheiten enthält, die beide ein relativ enges Molekularmassenspektrum aufweisen und deren Aktivitätsoptima zum einen 5 im stark Sauren, zum anderen aber im leicht Basischen liegen. Außerdem war auf Grund der bislang bekannten PLDs nicht zu erwarten, dass Isoenzyme mit PLD-Aktivität aus Mohn Zink-aktivierbar sind, was insbesondere im Hinblick auf deren Verwendung bei der Herstellung von Phospholipiden von Vorteil ist, die bekanntlich mit Ca-Ionen zumeist 10 unlösliche Komplexe bilden. Auf Grund der bislang vorliegenden Erkenntnisse mit Phospholipasen D aus pflanzlichen Quellen konnte außerdem nicht davon ausgegangen werden, dass in Vertretern der Familie der Papaveraceen Proteinfaktionen mit entsprechenden Aktivitäten aufgefunden werden.

15

Die vorliegende Erfindung beansprucht insbesondere eine Proteinfaktion, die aus *Papaver somniferum* (Schlafmohn) stammt und ganz besonders bevorzugt aus sich entwickelnden Keimlingen und/oder aus Endospermen. Vorstellbar ist natürlich auch eine Variante, bei der die Proteinfaktionen 20 indirekt aus *Papaver* stammen, indem diese nämlich mit Hilfe rekombinanter Methoden erhalten werden und vor allem mit Hilfe rekombinanter Mikroorganismen, die die Gene für die entsprechende Proteinfaktion enthalten.

25 Wie bereits ausgeführt, richtet sich ein erfindungswesentlicher Aspekt auf die Tatsache, dass die beanspruchte pflanzliche Proteinfaktion zwei Isoenzyme enthält. Diesbezüglich bevorzugt die vorliegende Erfindung eine Proteinfaktion, deren Unterfraktion A eine Molekularmasse zwischen 116 und 118 kDa, einen isoelektrischen Punkt *pI* zwischen 8,5 und 8,9 und ein 30 hydrolytisches Aktivitätsoptimum bei pH-Werten zwischen 7,8 und 8,2 besitzt und die Unterfraktion B eine Molekularmasse zwischen 112 und 115 kDa, einen isoelektrischen Punkt *pI* zwischen 6,5 und 6,9 und ein hydrolytisches

Aktivitätsoptimum bei pH-Werten zwischen 5,0 und 6,0.

Hinsichtlich des isoelektrischen Punktes kann durch weitere Aufreinigung isolierter Fraktionen ein definierter Wert erreicht werden.

5

Die Proteinfraktion der vorliegenden Erfindung ist aus diesem Grund auch insbesondere dadurch gekennzeichnet, dass die Unterfraktion A einen isoelektrischen Punkt  $pI$  von 8,7 und eine Molekularmasse von 116,4 kDa sowie ein hydrolytisches Aktivitätsoptimum bei pH 8,0 aufweist. Die

10 entsprechenden bevorzugten Werte der Unterfraktion B betragen hinsichtlich der Molekularmasse 114,1 kDa, hinsichtlich des isoelektrischen Punktes  $pI$  6,7 sowie ein hydrolytisches Aktivitätsoptimum, das bei pH 5,5 liegt. Auch diese Merkmale werden von der vorliegenden Erfindung umfasst.

15 Wie bereits angegeben, sind Proteinfraktionen mit Phospholipase D-Aktivität üblicherweise Calciumionen-abhängig. Diese ausgeprägte Abhängigkeit hat sich allerdings für die beanspruchte pflanzliche Proteinfraktion aus Papaveraceen, die zwingend  $Zn^{2+}$ -Ionen aktivierbar ist, nicht bestätigt. Allerdings kann das Aktivitätsoptimum dieser Proteinfraktion auch in

20 Gegenwart von Calcium-Ionenkonzentrationen erreicht werden, die dann üblicherweise zwischen 40 M und 100 mM liegen, wobei entsprechende Enzymaktivitäten bei Konzentrationen zwischen 2 und 20 mM und zwischen 5 und 15 mM auftreten.

25 Bezüglich der Unterfraktion B beansprucht die vorliegende Erfindung eine Protein-Variante, deren Aktivierbarkeitsoptimum in Gegenwart von  $Zn^{2+}$ -Ionenkonzentrationen auftritt, die zwischen 1,0 und 10 mM und besonders bevorzugt bei 5 mM liegen.

30 Als u.a. erfindungswesentlich sieht die vorliegende Erfindung vor, dass die Unterfraktionen A und/oder B Kohlenhydratanteile aufweisen, so dass sie also in glykosylierter Form als N-verknüpfte Glykoproteine vorliegen, und

dass es sich bei den Unterfraktionen A und B um Isoenzyme handelt.

Entsprechend der überraschend unterschiedlichen Aktivitätseigenschaften der Unterfraktionen A (ausschließlich Hydrolyse) und B (ausgeprägte

- 5 Transphosphatidylierung) umfasst die vorliegende Erfindung auch eine Variante der Proteinfraktion, bei der die Transphosphatidylierungs-Aktivität insgesamt stärker ausgeprägt ist als ihre Hydrolyse-Aktivität, was vor allem durch die Einzelaktivitäten der Unterfraktionen erklärbar ist und auch im Hinblick auf die bislang bekannten PLD-Varianten von Bedeutung ist, denen 10 gegenüber die neuen Proteinfraktionen bis 100 mal ausgeprägtere Transphosphatidylierungs-Aktivitäten bezogen auf die entsprechenden Hydrolyse-Aktivitäten aufweisen.

Neben der Proteinfraktion selbst beansprucht die vorliegende Erfindung auch

- 15 die Verwendung dieser Proteinfraktion zur Hydrolyse und/oder Transphosphatidylierung von Phospholipiden und/oder deren Lyso-Formen, wobei insbesondere die Synthese von Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylglycerin, Phosphatidylinosit, Phosphatidsäure, Phosphatidylserin, deren Lyso-Formen und beliebige 20 Mischungen beansprucht werden. Erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang auch die Tatsache, dass die erfindungsgemäße Proteinfraktion in der Lage ist, Phosphatidylinosit zu hydrolysieren bzw. am PI einen Kopfgruppenaustausch durchzuführen, was von den bislang bekannten PLDs so ebenfalls nicht bekannt ist. Dabei ist die 25 Reaktionsführung insgesamt als nicht kritisch anzusehen, doch haben sich als Reaktionsmedien organische und/oder wässrige Phasen und als Phospholipid-Quelle Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin als sehr geeignet erwiesen.
- 30 Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass mit dieser neuen pflanzlichen Proteinfraktion mit Phospholipase D-Aktivität aus Vertretern der Familie der Papaveraceae die Isolierung einer PLD gelungen ist, die insgesamt eine sehr

- 8 -

ausgeprägte Transphosphatidylierungs-Aktivität besitzt und deren beide isoenzymatische Unterfraktionen hydrolytische Aktivitäten insbesondere gegenüber Phosphatidylcholin aufweisen; beide Unterfraktionen sind zwar wie von PLDs bekannt durch Calciumionen aktivierbar, im Gegensatz zu 5 bekannten Phospholipase D-Varianten aus anderen Pflanzen kann die neue Proteinfraktion aber auch und vor allem durch Zn<sup>2+</sup>-Ionen aktiviert werden.

Die neue Proteinfraktion unterscheidet sich somit grundlegend von den bislang bekannten pflanzlichen PLDs und ihre Eigenschaften weichen 10 deutlich von den PLDs ab, deren Gensequenzen bereits ermittelt worden sind.

Die nachfolgenden Beispiele verdeutlichen die charakteristischen Merkmale der beanspruchten pflanzlichen Proteinfraktion mit Phospholipase D-Aktivität.

BeispieleAufarbeitung pflanzlichen Materials (Enzymgewinnung)

Mohn-Samen (*Papaver somniferum*) wurden auf einer 10 mm dicken

5 Polyurethan-Schaumschicht in Petrischalen, die mit einem Nylongewebe abgedeckt waren, in destilliertem Wasser zum Keimen gebracht. Der Keimungsprozess wurde in Dunkelheit bei 25 °C und 70 bis 80 % relativer Luftfeuchtigkeit durchgeführt. Am zweiten Tag nach dem Anquellen wurde von den Keimlingen das Endosperm entfernt.

10

Diese aus insgesamt 10 g frischem Mohn-Samen gewonnenen

Endospermen wurden mit einer geringen Menge kalten Acetons in einem Mörser verrieben und anschließend mit 300 ml kalten Acetons, das 300 g festes CO<sub>2</sub> enthielt, homogenisiert. Anschließend wurde das so erhaltene

15 Präzipitat mit kaltem Aceton so lange gewaschen, bis das Filtrat farblos und transparent war. Der vakuumgetrocknete Rückstand war in Pulverform für mehrere Monate bei 4 °C stabil.

2 g dieses Acetonpulvers wurden in 50 ml einer Mischung aus 0,1 molarem

20 Natriumacetat-Puffer/10 mM CaCl<sub>2</sub>/6 mM Cysteinhydrochlorid (pH 5,5) homogenisiert und bei 12 000 g bei 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Die daraus resultierenden Extrakte wurden mit (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (60 % Sättigung) behandelt und bei 26 000 g und 4 °C für 45 Minuten zentrifugiert. Der Niederschlag wurde anschließend in einer möglichst geringen Menge einer

25 Mischung aus 0,1 M Natriumacetat-Puffer/10 mM CaCl<sub>2</sub>/6 mM Cysteinhydrochlorid (pH 5,5) aufgenommen. Nach einer Dialyse gegen eine Mischung aus 0,01 molarem Natriumacetat-Puffer/50 mM CaCl<sub>2</sub> (pH 5,5) wurde die Enzymlösung auf eine Octyl-Sepharose CL-4B-Säule aufgetragen. Mit folgenden Lösungen wurden die Proteine mit einer Flussrate von 9 ml/h dreistufig eluiert: 0,01 M Natriumacetat-Puffer/50 mM CaCl<sub>2</sub>; 0,005 M Natriumacetat-Puffer/30 mM CaCl<sub>2</sub> (pH 5,5); 0,005 M Natriumacetat-Puffer/0,1 mM Ethyldiamin-Tetraessigsäure (EDTA), pH 5,5. Die

- 10 -

Enzymaktivität wurde mit Phosphatidyl-p-Nitrophenol (PpNP) bei pH-Werten von 5,5 und 8,0 bestimmt und die vereinten aktiven Fraktionen wurden mit Hilfe einer 100 kDa-Membran aufkonzentriert.

5 **Proteinbestimmung**

Der Proteingehalt wurde entsprechend der Standardmethode von M.M. Bradford (Anal. Biochem. 72, 1976, 248 – 254) mit Rinderserum-Albumin als Standard bestimmt.

10 **Hydrolytische Aktivität in wässrigen Systemen**

Die hydrolytische Aktivität der so erhaltenen pflanzlichen Proteinfraktion mit Phospholipase D-Aktivität wurde in einem wässrigen System ermittelt, indem das aus PpNP freigesetzte p-Nitrophenol bestimmt wurde (Methode nach P. D'Arrigo, V. Piergianni, D. Scarcelli, S. Servi, "A Spectrophotometric Essay for Phospholipase D", Anal. Chim. Acta, 304, 1995, 249 – 254).

Zur Charakterisierung der jeweiligen Aktivitäten der PLD-Unterfraktionen A und B wurden die Reaktionen bei unterschiedlichen pH-Werten in Gegenwart 20 von 10 mM CaCl<sub>2</sub>, in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen von CaCl<sub>2</sub> bei pH-Werten von 5,5 bzw. 8,0 sowie in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen von ZnCl<sub>2</sub> bei einem pH-Wert von 5,5 durchgeführt.

25 **Transphosphatidylierung und hydrolytische Aktivität in einem Zwei-Phasensystem**

Entsprechend der Methode gemäß N. Dittrich und R. Ulrich-Hofmann ("Transphosphatidylation by immobilised Phospholipase D in aqueous media", Biotechnol. Appl. Biochem. 34, 2001, 189 – 194) wurden die Transphosphatidylierungs- und Hydrolyseaktivitäten im Zwei-Phasensystem 30 bestimmt. Die entsprechenden Reaktionsmedien setzten sich aus einem Phosphatidylcholin enthaltenden Diethylether, Glycerin (zur Bestimmung der Transphosphatidylierungs-Aktivität) oder Wasser (zur Bestimmung der

Hydrolyse-Aktivität) sowie einem Gemisch aus Tris-HCl/CaCl<sub>2</sub> oder einem Gemisch aus Natriumacetat-Puffer/CaCl<sub>2</sub> und einem gereinigten Enzym (PLD-A und PLD-B) zusammen. Die jeweiligen Reaktionen wurden bei 30 °C in Reaktionsgefäßchen, die mit Teflon-Silikon-Septen verschlossen waren, bei 5 einer Schüttelfrequenz von 250/Min. durchgeführt. Während der Reaktion wurden Aliquote der organischen Phase(n) mittels HPTLC analysiert. Die Phospholipidgehalte wurden densitometrisch bei 550 nm gegenüber Standardmischungen aus Phosphatidylcholin, Phosphatidsäure und Phosphatidylglycerin bestimmt, wobei aus der Zunahme an 10 Phosphatidylglycerin oder Phosphatidsäure die Enzymaktivität berechnet wurde.

#### Bestimmung von Enzymmerkmalen

Die Bestimmung der Molekularmasse der gereinigten Proteine erfolgte mit 15 Hilfe einer Elektrophorese in Gegenwart von SDS mit einer Bio-Rad Mini Protein II Gel-Elektrophoresezelle unter Verwendung von Polyacrylamidgelen.

Die isoelektrischen Punkte der PLD-Unterfraktionen A und B wurden mit Hilfe 20 eines PhastGel IEF 3 – 9 on FastSystem Separation and Controll Unit (Pharmacia LKB Biotechnology) bestimmt, wobei pl IEF-Marker (liquid mix 3 – 10) für die Kalibrierung eingesetzt wurden. Die Proteine wurden mit Coomassie Brilliant Blue G-250 gefärbt.

25 Zur Glycoprotein-Bestimmung wurde ein SDS-PAGE-Gel, das PLD-A, PLD-B und Peroxidase (als Standard für ein glycosiliertes Protein) sowie Aldolase (als Standard eines nicht-glycosilierten Proteins) enthielt, mit einer Nitrocellulose-Membran bei 300 V und 5 mA/cm<sup>2</sup> über eine Dauer von 180 Minuten in Kontakt gebracht. Nach dem Proteintransfer wurde der 30 Gesamtkohlenhydrat-Gehalt mit einem ECL-Glycoprotein-Detektionsmodul bestimmt.

- 12 -

Mit einem 492 cLC-Protein-Sequencer (PE Applied Biosystems) wurden Sequenzierungen N-terminierter Aminosäuren durchgeführt.

Ergebnisse:

- 5 Die mit Hilfe einer hydrophoben Interaktionschromatographie zur Aufreinigung von PLD entsprechend R. Lambrecht, R. Ulrich-Hofmann ("A facile purification procedure of phospholipase D from cabbage and its characterization", Biol. Chem. Hoppe-Seyler 373, 1992, 81 – 88) erhaltenen zwei Enzymformen waren bei pH 8,0 (PLD-A) bzw. pH 5,5 (PLD-B) aktiv.
- 10 Durch den Austausch von  $\text{CaCl}_2$  durch  $\text{ZnCl}_2$  in Pufferlösungen, konnten die gleichen Aufreinigungsergebnisse erzielt werden. Beide Enzymunterfraktionen waren im SDS-PAGE-Gel homogen. Tabelle 1 veranschaulicht die Aufreinigungsdaten, wobei die Aufreinigungsfaktoren der beiden Isoenzyme 84,7 (PLD-A) bzw. 94,1 (PLD-B) betrugen.

15

Proteinbestimmung der beiden Unterfraktionen

Mit Hilfe der SDS-PAGE-Methode wurden die Molekularmassen der PLD-Unterfraktion-A und der PLD-Unterfraktion-B mit 116,4 bzw. 114,1 kDa bestimmt. Deren isoelektrischen Punkte lagen bei 8,7 (PLD-A) und 6,7 (PLD-B). Es konnte nachgewiesen werden, dass sowohl PLD-A als PLD-B in glycosilierter Form vorlagen, da eine positive Deglycosilierungsreaktion mit Hilfe von N-Glycosidase F das Vorhandensein eines N-gebundenen Kohlenhydrats für beide Unterfraktionen ergab. Da die N-terminale Sequenzierungsmethode an beiden Unterfraktionen versagte, ist davon auszugehen, dass in beiden Fällen eine N-terminale Modifizierung vorliegt.

pH-Aktivitätsprofile

Gegenüber PpNP ergaben sich hinsichtlich der hydrolytischen Aktivitäten der PLD-Unterfraktionen A und B und als Funktion des pH-Wertes signifikante Unterschiede. Die Unterfraktion A besitzt ein scharfes pH-Optimum bei pH 8,0, wo hingegen bei diesem pH-Wert die Aktivität der Unterfraktion B

unausgeprägt ist. Dem gegenüber liegt das pH-Optimum der Unterfraktion B bei pH 5,5, bei dem die Unterfraktion A kaum Aktivität zeigt. Unter jeweils optimalen Bedingungen zeigt die Unterfraktion B eine gegenüber der Unterfraktion A um 38 % ausgeprägtere Aktivität.

5

#### Einfluss von Metallionen

Hinsichtlich der von PLD-Varianten bekannten Aktivierung durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen wurde auch bezüglich der neuen Unterfraktionen A und B aus Schlafmohn eine Calciumionen-Abhängigkeit festgestellt, wobei ein Aktivitätsmaximum 10 mit einer 10 mM  $\text{CaCl}_2$ -Konzentration erzielt werden konnte. Mit  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen konnte eine nur sehr geringfügige Aktivierung der beiden Untereinheiten erzielt werden, wohingegen  $\text{Zn}^{2+}$ -Ionen die PLD-Unterfraktionen A und vor allem B stärker aktivierten als Calciumionen. Mit einer optimalen  $\text{Zn}^{2+}$ -Ionenkonzentration (5 mM) konnte die Unterfraktion B um mehr als das 15 vierfache stärker aktiviert werden, als mit den optimalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkonzentrationen.

#### Transphosphatidylierungs- und hydrolytische Aktivitäten in einem 2-Phasen-System

20 In einem biphasischen System bestehend aus einem Natriumacetat- (pH 5,5) oder Tris-HCl-Puffer (pH 8,0) und 40 mM  $\text{CaCl}_2$ , Diethylether mit Phosphatidylcholin als Substrat und Glycerin als Akzeptor-Alkohol, wurden die Transphosphatidylierungs-Potentiale der Unterfraktionen A und B mittels HPTLC und densitometrischer Quantifizierung der Reaktionsprodukte 25 bestimmt. Die PLD-Unterfraktion B besaß bei pH 5,5 ein großes Transphosphatidylierungs-Potential, da nach 240 Minuten mehr als 80 % des Phosphatidylcholins in das Transphosphatidylierungs-Produkt Phosphatidylglycerin umgewandelt worden waren, wohingegen unter diesen Reaktionsbedingungen keinerlei Phosphatidsäure gefunden werden konnte. 30 Bei einem pH-Wert von 8,0 konnten für PLD-B weder eine Transphosphatidylierung noch eine Hydrolyse festgestellt werden. Die PLD-Unterfraktion A zeigte weder bei pH 5,5 noch pH 8,0 eine

- 14 -

Transphosphatidylierungs-Aktivität, wie erwartet zeigte sie aber eine ausgeprägte Hydrolyse-Aktivität bei pH 8,0.

**Tabelle 1:** Aufreinigung von Proteinfraktionen mit PLD-Aktivität aus Schlafrmohn-Samen.  
 Die hydrolytische PLD-Aktivität der Proteinfraktion wurde gegenüber PpNP bei pH 8,8 und 5,0 bestimmt.

Reinigungsschritt	Protein [mg]	Aktivität [ $\mu\text{mol min}^{-1}$ ]		Spezifische Aktivität [ $\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ ]
		pH 8,0	pH 5,5	
Rohextrakt *	43,25	3,74	4,65	0,09
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Präzipitat **	9,56	1,99	2,38	0,21
Octyl-Sepharose CL-4B				0,11
Unterfraktion A (PLD-A)	0,14	1,05	-	0,25
Unterfraktion B (PLD-B)	0,18	-	1,85	-
				10,13

\* nach Homogenisieren des Acetonpulvers und Zentrifugieren bei 12 000 g.

\*\* nach Zentrifugieren des Präzipitats bei 26 000 g und anschließender Dialyse.

## Ansprüche

1. Pflanzliche, aus Vertretern der Familie Papaveraceae stammende Proteinfraktion mit Phospholipase D-Aktivität, **dadurch gekennzeichnet**, dass
  - a) sie aus zwei Protein-Unterfraktionen A und B besteht und
  - b) sie durch  $Zn^{2+}$ -Ionen aktivierbar ist sowie
  - c) die Unterfraktionen A und/oder B Kohlenhydratanteile aufweisen, und wobei die Protein-Unterfraktion A ausschließlich eine Hydrolyse-Aktivität besitzt.
2. Proteinfraktion nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass sie aus *Papaver somniferum* stammt und ganz besonders bevorzugt aus sich entwickelnden Keimlingen und/oder aus Endospermen.
3. Proteinfraktion nach einem der Ansprüche 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Unterfraktion A eine Molekularmasse zwischen 116 und 118 kDa, einen isoelektrischen Punkt *pl* zwischen 8,5 und 8,9 und ein hydrolytisches Aktivitätsoptimum bei pH-Werten zwischen 7,8 und 8,2 und die Unterfraktion B eine Molekularmasse zwischen 112 und 115 kDa, einen isoelektrischen Punkt *pl* zwischen 6,5 und 6,9 und ein hydrolytisches Aktivitätsoptimum bei pH-Werten zwischen 5,0 und 6,0 besitzen.
4. Proteinfraktion nach einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Unterfraktion A eine Molekularmasse von 116,4 kDa, einen isoelektrischen Punkt *pl* von 8,7 und ein hydrolytisches Aktivitätsoptimum bei pH 8,0 aufweist.
5. Proteinfraktion nach einem der Ansprüche 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Unterfraktion B eine Molekularmasse von

114,1 kDa, einen isolektrischen Punkt pl von 6,7 und ein hydrolytisches Aktivitätsoptimum bei pH 5,5 aufweist.

6. Proteinfraktion nach einem der Ansprüche 1 bis 5, **dadurch**

5 **gekennzeichnet**, dass die Unterfraktion B ein Aktivierbarkeitsoptimum bei Zn<sup>2+</sup>-Ionenkonzentrationen zwischen 1,0 und 10 mM und besonders bevorzugt bei 5 mM besitzt.

7. Proteinfraktion nach einem der Ansprüche 1 bis 6, **dadurch**

10 **gekennzeichnet**, dass es sich bei den Unterfraktionen A und B um Isoenzyme handelt.

8. Proteinfraktion nach einem der Ansprüche 1 bis 7, **dadurch**

15 **gekennzeichnet**, dass ihre Transphosphatidylierungs-Aktivität stärker ausgeprägt ist als ihre Hydrolyse-Aktivität.

9. Verwendung der Proteinfraktion nach einem der Ansprüche 1 bis 8, zur Hydrolyse und/oder Transphosphatidylierung von Phospholipiden und/oder deren Lyso-Formen.

10. Verwendung nach Anspruch 9 zur Synthese von Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylglycerin, Phosphatidylinosit, Phosphatidsäure, Phosphatidylserin und deren Lyso-Formen.

25 11. Verwendung nach einem der Ansprüche 9 oder 10 in Form einer Hydrolyse von Phosphatidylinosit und/oder eines Kopfgruppenaustausches an Phosphatidylinosit.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 03/09625

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
 IPC 7 C12N9/16 C12N9/20

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
 IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, MEDLINE, BIOSIS, EMBL, WPI Data, PAJ

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>BEZAKOVA L ET AL: "Phospholipase D activity of poppy seedlings, Papaver somniferum L"  <b>CHEMISTRY AND PHYSICS OF LIPIDS</b>,    vol. 107, no. 1, September 2000 (2000-09),    page 22 XP009023652    41st International Conference on the    Biochemistry of Lipids; Halle, Germany;    September 13-16, 2000    ISSN: 0009-3084    the whole document</p> <p>----</p> <p>-/-</p>	1-11

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the International search

19 January 2004

Date of mailing of the International search report

13/02/2004

Name and mailing address of the ISA  
 European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Griesinger, I

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 03/09625

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EMBL 'Online! Papaver phospholipase D1 mRNA, 20 December 2001 (2001-12-20) retrieved from EMBL Database accession no. AF451979 XP002267302 cited in the application ---	1-11
X	DATABASE EMBL 'Online! Papaver phospholipase D2 mRNA, 20 December 2001 (2001-12-20) retrieved from EMBL Database accession no. AF451980 XP002267303 cited in the application ---	1-11
A	PAPPAN K ET AL: "Molecular and biochemical properties and physiological roles of plant phospholipase D" vol. 1439, no. 2, 30 July 1999 (1999-07-30), pages 151-166, XP004277191 page 158, right-hand column, paragraph 1 -page 159, left-hand column, paragraph 1 ---	1-11
A	WANG X ET AL: "PURIFICATION AND IMMUNOLOGICAL ANALYSIS OF PHOSPHOLIPASE D FROM CASTOR BEAN ENDOSPERM" ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS, NEW YORK, US, US, vol. 306, no. 2, 1 November 1993 (1993-11-01), pages 486-494, XP001154051 ISSN: 0003-9861 abstract ---	1-11
P,X	OBLOZINSKY M ET AL: "Two uncommon phospholipase D isoenzymes from poppy seedlings (Papaver somniferum L.)" vol. 1631, no. 2, 17 March 2003 (2003-03-17), pages 153-159, XP004414261 abstract -----	1-11

INTERNATIONALES RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/09625

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 7 C12N9/16 C12N9/20

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
IPK 7. C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, MEDLINE, BIOSIS, EMBL, WPI Data, PAJ

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	BEZAKOVA L ET AL: "Phospholipase D activity of poppy seedlings, Papaver somniferum L" CHEMISTRY AND PHYSICS OF LIPIDS, Bd. 107, Nr. 1, September 2000 (2000-09), Seite 22 XP009023652 41st International Conference on the Biochemistry of Lipids; Halle, Germany; September 13-16, 2000 ISSN: 0009-3084 das ganze Dokument ---	1-11 -/-

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem Internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung,

eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem Internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem Internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche

Absendedatum des Internationalen Recherchenberichts

19. Januar 2004

13/02/2004

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Griesinger, I

## INTERNATIONALER FORSCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP 03/09625

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DATABASE EMBL 'Online! Papaver phospholipase D1 mRNA, 20. Dezember 2001 (2001-12-20) retrieved from EMBL Database accession no. AF451979 XP002267302 in der Anmeldung erwähnt ----	1-11
X	DATABASE EMBL 'Online! Papaver phospholipase D2 mRNA, 20. Dezember 2001 (2001-12-20) retrieved from EMBL Database accession no. AF451980 XP002267303 in der Anmeldung erwähnt ----	1-11
A	PAPPAN K ET AL: "Molecular and biochemical properties and physiological roles of plant phospholipase D" Bd. 1439, Nr. 2, 30. Juli 1999 (1999-07-30), Seiten 151-166, XP004277191 Seite 158, rechte Spalte, Absatz 1 -Seite 159, linke Spalte, Absatz 1 ----	1-11
A	WANG X ET AL: "PURIFICATION AND IMMUNOLOGICAL ANALYSIS OF PHOSPHOLIPASE D FROM CASTOR BEAN ENDOSPERM" ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS, NEW YORK, US, US, Bd. 306, Nr. 2, 1. November 1993 (1993-11-01), Seiten 486-494, XP001154051 ISSN: 0003-9861 Zusammenfassung ----	1-11
P,X	OBLOZINSKY M ET AL: "Two uncommon phospholipase D isoenzymes from poppy seedlings (Papaver somniferum L.)" Bd. 1631, Nr. 2, 17. März 2003 (2003-03-17), Seiten 153-159, XP004414261 Zusammenfassung -----	1-11